

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-313124

(P2003-313124A)

(43) 公開日 平成15年11月6日 (2003. 11. 6)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マ-ト (参考)

A 6 1 K 31/19

A 6 1 K 31/19

4 C 2 0 6

A 6 1 P 27/02

A 6 1 P 27/02

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2003-40807 (P2003-40807)

(22) 出願日 平成15年2月19日 (2003. 2. 19)

(31) 優先権主張番号 特願2002-43215 (P2002-43215)

(32) 優先日 平成14年2月20日 (2002. 2. 20)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年1月25日
発行の「第26回角膜カンファランス・第18回日本角膜移
植学会 プログラム・抄録集」に発表

(71) 出願人 595149793

株式会社オフテクス

大阪府大阪市西区江戸堀1丁目9番1号

(72) 発明者 齋藤 靖和

兵庫県豊岡市神美台156-5 株式会社オ
フテクス研究所内

(72) 発明者 中嶋 英雄

兵庫県豊岡市神美台156-5 株式会社オ
フテクス研究所内

(72) 発明者 中村 滋

兵庫県豊岡市神美台156-5 株式会社オ
フテクス研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害の予防および／または治療のための組成物

(57) 【要約】

【課題】 アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害の予防および／または治療のための組成物を提供する。

【解決手段】 アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害の予防および／または治療のための組成物であって、該組成物が3-ヒドロキシ酪酸および／またはその塩類を有効成分として含有することを特徴とする組成物により達成できる。さらには、上記有効成分を含有する、簡便で且つ効果的な、アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害、特に角結膜の障害の予防および／または治療のための組成物により達成できる。

7

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害の予防および／または治療のための組成物であって、該組成物が3-ヒドロキシ酪酸および／またはその塩類を有効成分として含有することを特徴とする組成物。

【請求項2】 3-ヒドロキシ酪酸がD-体であることを特徴とする請求項1記載の組成物。

【請求項3】 3-ヒドロキシ酪酸の塩類が、ナトリウム塩、カリウム塩、L-リジン塩、L-ヒスチジン塩およびL-アルギニン塩からなる群より選ばれる少なくとも1種である請求項1または請求項2記載の組成物。

【請求項4】 3-ヒドロキシ酪酸および／またはその塩類の濃度が、0.1～1000mmol/Lである請求項1～請求項3のいずれかに記載の組成物。

【請求項5】 3-ヒドロキシ酪酸および／またはその塩類の濃度が、1～150mmol/Lである請求項1～請求項4のいずれかに記載の組成物。

【請求項6】 ドライアイにより生じる眼障害が、角結膜の障害である請求項1～請求項5のいずれかに記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害の予防および／または治療のための組成物であって、該組成物が3-ヒドロキシ酪酸および／またはその塩類を有効成分として含有することを特徴とする組成物に関する。さらに詳しくは、上記有効成分を含有し、簡便で且つ効果的な、アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害、特に角結膜の障害の予防および／または治療のための組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 アポトーシス (apoptosis) は、細胞の遺伝子に制御された細胞自壊プログラムが発動することによって起こる細胞死である。このアポトーシスの特徴は、細胞縮小、クロマチン凝集、クロマチンDNAの断片化、アポトーシス小体の出現・細胞断片化等があり、短時間のうちに進行する能動的な細胞死の形態であると考えられている。

【0003】 また、アポトーシスは、生物の発生過程やホメオスタシスの維持等において必須の現象であるが、自然発生、栄養因子や増殖因子といった諸因子の欠乏、放射線等の物理的ストレス等により誘導され、その他にも、例えば細胞培養において、培地より血清を除去することにより誘導されることも知られている。

【0004】 現在、このアポトーシスは、様々な疾患に関与していることが示唆されているが、なかでも、眼に関する疾患としては、虚血・再灌流による網膜障害、緑内障、視神経切断、網膜剥離、網膜変性症、白内障、

さらには、近年急速に増加してきた眼障害の1つであるドライアイもまた、アポトーシスが関与していると考えられている。

【0005】 これまで、ドライアイに対する治療法としては、主に自覚症状を軽減させる対症療法が行われている。そのような対症療法としては、例えば人工涙液等（ヒアルロン酸ナトリウム含有人工涙液等）の点眼、涙点閉鎖、ドライアイ保護用眼鏡の使用といった方法等が挙げられる。

10 【0006】 近年、ドライアイ患者、特に重症ドライアイ患者の症状を改善するために、血清を用いる方法が注目されつつあり、特に患者本人の血清（自己血清）を用いて治療する方法が注目を浴びつつある。さらに、この自己血清点眼においては、20%自己血清を点眼することにより、ドライアイ患者の症状改善に、優れた効果があることが知られている（例えば、非特許文献1参照）。また、現在では、この自己血清を点眼することにより、角膜上皮細胞のアポトーシスが抑制されることも示唆されている（例えば、非特許文献2参照）。

20 【0007】 しかしながら、上述した対症療法は、一時的な症状軽減といった効果はあるものの、ドライアイそのものの治療効果はなく、根治的な治療ができるものではなかった。また、血清を用いる方法においては、血清は保存可能期間が長くはないため、たびたび患者より採血を行い、血清を得る必要があり、手間がかかることや、患者自身の負担も大きいといった問題点があった。さらに、採取した自己血清の管理を十分に行わなければならないといった問題もあった。それゆえ、ドライアイ患者の症状を改善するにあたり、人工涙液等の点眼といった対症療法ではなく、簡便で且つ効果的にドライアイにより生じる眼障害を治療する点眼剤の開発が待たれている。

30 【0008】 また、アポトーシスが関連するドライアイの治療剤および治療方法が提案されている。そのような例としては、抗Fasモノクローナル抗体を有効成分とするドライアイ治療剤が開示されている（例えば、特許文献1参照）。しかしながら、本発明の有効成分である3-ヒドロキシ酪酸および／またはその塩類が、アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害の予防および／または治療に有効であることは知られていない。

【0009】

【特許文献1】 特開平10-194989号公報

【非特許文献1】 Kazuo Tsubota, et al., 「Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome」、Br. J. Ophthalmol., 1999年、83巻、p390-395

【非特許文献2】 坪田一男、「眼科研究のたのしいアプローチ」、あたらしい眼科、株式会社メディカル葵出版、2001年4月30日、18巻、4号、p491-

492

【0010】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害の予防および／または治療のための組成物であって、該組成物が3-ヒドロキシ酪酸および／またはその塩類を有効成分として含有することを特徴とする組成物を提供することにある。さらに詳しくは、上記有効成分を含有し、簡便で且つ効果的な、アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害、特に角結膜の障害の予防および／または治療のための組成物を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】 本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、以下により達成される。

(1) アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害の予防および／または治療のための組成物であって、該組成物が3-ヒドロキシ酪酸および／またはその塩類を有効成分として含有することを特徴とする組成物。

(2) 3-ヒドロキシ酪酸がD-体であることを特徴とする上記(1)記載の組成物。

(3) 3-ヒドロキシ酪酸の塩類が、ナトリウム塩、カリウム塩、L-リジン塩、L-ヒスチジン塩およびL-アルギニン塩からなる群より選ばれる少なくとも1種である上記(1)または上記(2)記載の組成物。

(4) 3-ヒドロキシ酪酸および／またはその塩類の濃度が、0.1~1000mmol/Lである上記(1)~上記(3)のいずれかに記載の組成物。

(5) 3-ヒドロキシ酪酸および／またはその塩類の濃度が、1~150mmol/Lである上記(1)~上記(4)のいずれかに記載の組成物。

(6) ドライアイにより生じる眼障害が、角結膜の障害である上記(1)~上記(5)のいずれかに記載の組成物。

【0012】

【発明の実施の形態】 本発明において、有効成分として用いられる3-ヒドロキシ酪酸は、生体成分として知られており、肝臓で脂肪酸が酸化されることにより生成され、末梢組織においてエネルギー源として用いられることが知られている(山科郁男監修、「レーニンジャーの新生化学(上)」、第2版、廣川書店、1993年4月15日、p625-626参照)。3-ヒドロキシ酪酸の化学構造式のC3位の立体配置に関しては、D-体、D、L-ラセミ体およびL-体が知られている。本発明においては、これら全てを使用することができるが、アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害の予防および／または治療の上で、これらのうちD-体が最も好ましい。また、3-ヒドロキシ酪酸の塩類は、好ましくは、ナトリウム塩、カリウム塩、L-リジ

ン塩、L-ヒスチジン塩およびL-アルギニン塩からなる群より少なくとも1種が適宜選択される。これら3-ヒドロキシ酪酸および／またはその塩類は、適宜単独であるいは2種類以上併用することができる。本発明の組成物における3-ヒドロキシ酪酸および／またはその塩類の濃度は、患者の年齢や症状、またその用途に応じて0.1~1000mmol/L、より好ましくは0.5~500mmol/L、さらには1~150mmol/Lの範囲にあるのが特に好ましい。

【0013】 本発明において、有効成分である3-ヒドロキシ酪酸は、アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害の予防および／または治療に対して有効である。さらに詳しくは、上記有効成分を含有する本発明の組成物は、アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害、特に角結膜の障害の予防および／または治療に対して有効である。

【0014】 本発明の組成物は、経口的(錠剤、顆粒等)にあるいは非経口的(点眼剤、点滴剤等)に適宜使用される。本発明の組成物からなる製剤の形態としては、例えば、点眼剤、点滴剤、注射剤、眼軟膏剤、錠剤、顆粒、散剤、カプセル剤等が挙げられ、いずれも公知の方法で適宜調製することができる。これら製剤には通常用いられる等張化剤、緩衝剤、安定化剤、防腐剤、粘稠剤、pH調整剤、賦形剤、結合剤、分散剤、再吸収促進剤、界面活性剤、溶解補助剤、乳化剤、保湿剤、着色剤、香料、有機溶媒(例えばアルコール類、油類)、シリコーン類、重合体、固体脂肪物質(例えばワックス類)等を含有することができ、用途に応じて適宜選択し、調製することができる。

【0015】 本発明の組成物は、上記に挙げた製剤の形態のなかでも、特に眼に対して局所投与する上で、点眼剤または眼軟膏剤とするのが好ましく、さらには、点眼剤とするのがより好ましい。

【0016】 例えば、本発明の組成物を点眼剤とする場合には、点眼剤の安定性およびさし心地の良さを得ることを目的として、必要に応じて等張化剤、緩衝剤、安定化剤、粘稠剤、pH調整剤等を含有することができる。なお、これらの成分は単独であるいは2種類以上適宜含有することができ、多くの場合その方が好ましい。

【0017】 本発明の組成物を点眼剤とする場合に含有することができる等張化剤としては、一般に点眼剤として用いられているものであれば特に差し支えない。等張化剤は本発明の組成物を点眼剤とする場合に、該点眼剤の浸透圧を調製する目的等で含有することができる。そのような等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウムおよび硫酸マグネシウム等からなるアルカリまたはアルカリ土類金属塩の如き無機塩、およびグルコース、マンニトール、ソルビトール、キシリトールおよびデキストラン等の糖質等が挙げられる。これらは単独であるいは

2種類以上併用することができる。これら等張化剤の濃度としては、0.001~5w/v%であるのが好ましく0.01~3w/v%であるのがより好ましい。

【0018】 本発明の組成物を点眼剤とする場合に含有することができる緩衝剤としては、一般に点眼剤として用いられているものであれば特に差し支えない。緩衝剤は本発明の組成物を点眼剤とする場合に、該点眼剤のpHを安定化する目的等で含有することができる。そのような緩衝剤としては、例えば、リン酸一水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸一水素二カリウムおよびリン酸二水素カリウムの如きリン酸系緩衝剤、ホウ酸およびホウ酸ナトリウムの如きホウ酸系緩衝剤ならびにトリスアミノメタンと希塩酸およびトリスマレートと希カセイソーダ液の如きトリス系緩衝剤等が挙げられる。これらは単独であるいは2種類以上併用することができる。これら緩衝剤の濃度としては、0.001~5w/v%であるのが好ましく、0.01~1w/v%であるのがより好ましい。

【0019】 本発明の組成物を点眼剤とする場合に含有することができる安定化剤としては、一般に点眼剤として用いられているものであれば特に差し支えない。安定化剤は本発明の組成物を点眼剤とする場合に、該点眼剤の有効成分を安定化する目的等で含有することができる。そのような安定化剤としては、例えばエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、クエン酸およびクエン酸塩等が挙げられる。これらは単独であるいは2種類以上併用することができる。これら安定化剤の濃度としては、0.001~5w/v%であるのが好ましく、0.01~1w/v%であるのがより好ましい。

【0020】 本発明の組成物を点眼剤とする場合に含有することができる粘稠剤としては、一般に点眼剤として用いられているものであれば特に差し支えない。粘稠剤は本発明の組成物を点眼剤とする場合に、該点眼剤の粘度を調製する目的等で含有することができる。そのような粘稠剤としては、例えば、グリセリン、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールおよびポリビニルアルコールなどのポリオール類、トレハロース、シュクロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースおよびシクロデキストリン等の糖質類、カルボキシビニルポリマー、クエン酸塩およびエデト酸塩等のポリカルボン酸/塩等が挙げられ、その他ヒアルロン酸塩、ポビドン等も含有することができる。これらは単独であるいは2種類以上併用することができる。これら粘稠剤の濃度としては、0.001~10w/v%であるのが好ましく、0.01~5w/v%であるのがより好ましい。

【0021】 本発明の組成物を点眼剤とする場合に含有することができるpH調整剤としては、一般に点眼剤として用いられているものであれば特に差し支えない。

pH調整剤は本発明の組成物を点眼剤とする場合に、該点眼剤のpHを調製する目的等で含有することができる。そのようなpH調整剤としては、例えば、塩酸、クエン酸またはその塩、ホウ酸またはその塩、リン酸またはその塩、酢酸またはその塩、酒石酸またはその塩、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等が挙げられる。これらは単独であるいは2種類以上併用することができる。本発明の組成物は、これらpH調整剤を適量添加し、目的のpHに調製する。

10 【0022】 一方、本発明の組成物を点眼剤とする場合には防腐剤を含有することもできる。その際、含有することができる防腐剤としては、一般に点眼剤として用いられているものであれば特に差し支えない。防腐剤は本発明の組成物を点眼剤とする場合に、該点眼剤に防腐効果を持たせる目的等で含有することができる。そのような防腐剤としては、例えばエチルパラベン、ブチルパラベン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、グルコン酸クロルヘキシジン、クエン酸およびホウ酸等が挙げられる。これらは単独であるいは2種類以上併用することができる。これら防腐剤の濃度としては、0.0001~0.1w/v%であるのが好ましく、0.001~0.05w/v%であるのがより好ましい。

20 【0023】 しかしながら、一般にドライアイにより生じる眼障害がある場合には、防腐剤を含有する点眼剤を点眼することにより、さらに眼障害が悪化する可能性があるため、防腐剤は含有しない方がより好ましい。また、眼に障害を生じていない場合であっても、頻回点眼を必要とする場合には、同様に防腐剤により眼に障害を生じる可能性があるため、防腐剤を含有しない方がより好ましい。なお、防腐剤を含有しない場合には、本発明の点眼剤を1回の使用で使い捨てるタイプの容器、いわゆる「ディスポ容器」に充填するのが好ましい。

30 【0024】 また、本発明の組成物を点眼剤とする場合には、その他の成分として、眼科用剤として一般に用いられる抗ヒスタミン剤、血管収縮剤、消炎・収斂剤、潤滑剤、アミノ酸、抗アレルギー剤、ビタミン類、サルファ剤、局所麻酔剤および縮瞳剤等を含有することもできる。なお、これらの成分を含有する際には、患者の年齢や症状等に応じて、有効成分である3-ヒドロキシ酪酸の効果に影響がでない成分・濃度とする必要がある。

40 【0025】 また、本発明の組成物を点眼剤とする場合には、各種成分を組み合わせるpH範囲をpH5~8とするのが好ましい。pH5以下の酸性またはpH8以上のアルカリ性領域では眼刺激や眼障害を生じる可能性があるため好ましくない。また、浸透圧については、眼に対して安全であるように、150~700mOsmの範囲とするのが好ましい。

50 【0026】 本発明の組成物を点眼剤とする場合には、眼科的に供与される範囲内であれば投与量が特に制限されるものではなく、通常、1回につき1~3滴を1

日数回程度投与するのが好ましい。

【0027】

【実施例】 以下、本発明を実施例および比較例により具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0028】 実施例1

ラットドライアイモデルを用いて、本発明の有効成分であるD-3-ヒドロキシ酪酸（以下、HBAと略す）のドライアイにより生じる眼障害に対する効果を調べた。

【0029】 ラットドライアイモデルは以下のようにして作製した。まず、8週齢の雄性SDラットを、通常環境下（温度：23±2℃、相対湿度60±10％）にて1週間馴化した。馴化後、SDラットの角膜上皮中央部を約0.4mm²程度円状に剥離した。その剥離したSDラットを乾燥環境下（温度：23±2℃、相対湿度：28±2％）にて飼育し、さらにその間においてはラットに向けて扇風機にて風速2～4m/sの送風を行った。この方法により、ドライアイ症状に近いラットドライアイモデルを作製することができた。

【0030】 上記方法にて作製したラットドライアイモデルを用い、40mmol/Lおよび80mmol/LのHBAをリン酸緩衝溶液（以下PBSと略す）に溶解した点眼液（浸透圧300mOsm、pH7.4）、0.3%ヒアルロン酸ナトリウム配合の医薬品A（以下、医薬品Aと略す）、20%ラット血清溶液、PBS（浸透圧300mOsm、pH7.4）を用い *

	No. 1		No. 2		No. 3	
眼	左眼	右眼	左眼	右眼	左眼	右眼
点眼液	PBS	点眼なし	PBS	40mmol/L HBA	PBS	80mmol/L HBA
角膜上皮剥離面積(mm ²)	6.32±3.85	7.52±2.52	6.60±2.98	5.47±2.35	8.18±2.94	5.35±3.49
検定(有意差)	なし		p<0.05		p<0.01	

HBAはD-3-ヒドロキシ酪酸を示す。

【0033】

【表2】

	No. 4		No. 5	
眼	左眼	右眼	左眼	右眼
点眼液	PBS	医薬品A	PBS	20%血清溶液
角膜上皮剥離面積(mm ²)	8.42±3.01	7.22±4.81	7.32±2.22	3.92±4.33
検定(有意差)	なし		p<0.01	

【0034】 上記の結果より、左眼をPBS、右眼を点眼なしとしたNo. 1においては、検定においては有意差はなかった。また、右眼をヒアルロン酸製剤である医薬品Aで点眼したNo. 4においては、医薬品AとPBSにおいて有意差は見られなかった。一方、右眼を40mmol/L HBAで点眼したNo. 2においては、PBSに比べて有意に角膜上皮剥離面積拡大を抑制しており、さらに右眼を80mmol/L HBAで点眼したNo. 3においても、PBSに比べて有意に角膜上皮剥離面積拡大を抑制することが示された。

* て、それぞれの点眼液の角膜上皮剥離面積拡大抑制効果について調査した。なお、点眼においては、各ラットドライアイモデルの左眼にコントロールとしてPBSを点眼し、同個体の右眼に各種の点眼液を点眼した。また、点眼は各点眼液を10μLずつとした。

【0031】 各種の点眼液は、ラットドライアイモデル作成直後に1回目の点眼を行い、その後1時間おきに、計12回点眼を行った。最後の点眼から1時間後に、ラット前眼部に1%フルオレセインナトリウムを点眼し、強制的に瞬目させた後、0.9%塩化ナトリウム1mLで前眼部を2回洗浄し、余分なフルオレセインナトリウムを洗い流した。その後、コバルトブルーライトをあて、写真撮影を行った。撮影した写真をスキャナーにて取り込み、画像処理ソフト(Photoshop; Adobe社製、NIH Image; NIH製)を用いて解析し、フルオレセイン染色面積(pixel数)を求めた。その面積を換算式(1pixel=0.00133mm²)にて換算し、換算後の値を角膜上皮剥離面積とした。その結果を表1および表2に示す。なお、1つの処理につき各12個体を用い、さらにその角膜上皮剥離面積について、左眼と右眼での検定を行った。検定は、対応のあるt検定を行った。また、表中の値は、平均値±標準偏差で示した。

【0032】

【表1】

*

【0035】 また、No. 3、No. 4および20%血清溶液を用いたNo. 5のそれぞれで左眼(PBSを点眼)の角膜上皮剥離面積と、右眼(各種の点眼液を点眼)の角膜上皮剥離面積とを比較した。その結果、ヒアルロン酸製剤である医薬品Aでは、左眼に比べ85.7% (14.3%の抑制)であったのに対し、80mmol/L HBAでは、左眼に比べ65.4% (34.6%の抑制)であった。また、20%血清では、左眼に比べ53.6% (46.4%の抑制)であった。これらの結果より、D-3-ヒドロキシ酪酸は、ドライアイにより生じる眼障害を抑制する効果、特に角結膜の障害を治療する効果を有しており、現在、対処療法として用いられているヒアルロン酸製剤の点眼よりも優れた効果を示した。また、血清点眼よりは若干劣るものの、その有用性は確保され、本発明の有効成分であるD-3-ヒドロキシ酪酸は、ドライアイにより生じる眼障害の予防および/または治療、特に角結膜の障害の予防および/または治療のための組成物として有用であることが分か

った。

【0036】 実施例2

アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害において、このアポトーシスに特徴的なクロマチン凝集について、HBAを用いて調査した。なお、本実施例は下記の方法にて行った。

①実施例1に示した方法にてラットドライアイモデルを作製し、該モデル作製直後に1回目の点眼を行い、その後1時間おきに、計6回点眼を行った。なお、点眼液は、80mmol/L HBA溶液（浸透圧300mOsm、pH7.4）およびPBS（浸透圧300mOsm、pH7.4）を使用した。また、点眼は各点眼液を10μLずつとした。

②最後の点眼を行った後、各ラットドライアイモデルの角膜上皮細胞を採取し、該細胞にHoechst33342（以下Hoと略す）色素をPBSに溶解し10μg/mLとした溶液を、wellあたり100μL加えて、CO₂インキュベータ内にて30分間インキュベートした。

③溶液を回収し、蛍光プレートリーダー（Applied Bio Systems社製）にて、励起波長360nm、蛍光波長450nmにおける各溶液の蛍光強度を測定した。

④測定後のサンプルを回収し、PBSで細胞を洗浄後、ニュートラルレッド（以下Nrと略す）を199培地（日水製薬社製）に溶解し0.005%とした溶液を、wellあたり200μL加えて、CO₂インキュベータ内にて3時間インキュベートした。

⑤染色液を除去し、PBSで細胞を2回洗浄した後、室温にて15分間、着色した細胞を1%酢酸・50%エタノール溶液で処理し、Nrを抽出した。

⑥抽出液を蛍光プレートリーダー（Applied Bio Systems社製）にて、励起波長535nm、蛍光波長600nmにおける各溶液の蛍光強度を測定した。

⑦各溶液（Ho液およびNr液）の蛍光強度からブランクとして求めた各溶液の蛍光強度（Ho液のみおよびNr液のみで測定した値）を引いたものをHo値およびNr

* r値とした。

⑧無処置群のHo値およびNr値の平均値を1.0とした場合の、処置群の各個体のHo相対値およびNr相対値を算出した。

⑨Ho相対値をNr相対値で割り、各個体のHo/Nr ratioを求めた。

上記の方法に従って行った結果を図1に示す。ここで、Ho/Nr値は単位細胞あたりのクロマチン凝集度を示す。また、無処置群ではHo/Nr値は1.0となり、1.0より値が大きくなると、アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害が、拡大していることを示している。さらに、1.0より値が小さくなると、ネクローシス（壊死）が起こっていることを示す。

【0037】 図1に示した結果より、80mmol/L HBA溶液を点眼したラットドライアイモデルの角膜上皮細胞は、PBSを点眼したラットドライアイモデルの角膜上皮細胞と比べて、有意に単位細胞あたりのクロマチン凝集度が少ないことから、HBAは、ドライアイにより生じる眼障害において見られるアポトーシスによる細胞死を抑制していることが分かった。すなわち、本発明の有効成分であるD-3-ヒドロキシ酪酸は、アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害の予防および/または治療、特に角結膜の障害の予防および/または治療のための組成物として有用であることが分かった。

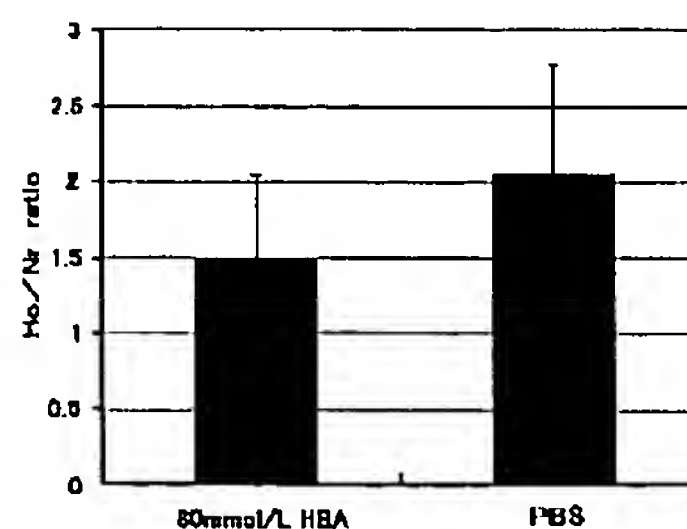
【0038】

【発明の効果】 本発明の組成物は、3-ヒドロキシ酪酸および/またはその塩類を有効成分として含有することにより、アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害の予防および/または治療をすることができる。さらには、上記有効成分を含有することにより、簡便で且つ効果的に、アポトーシスに起因するドライアイにより生じる眼障害、特に角結膜の障害の予防および/または治療をすることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 HBAおよびPBS点眼処理後のラットドライアイモデルにおける角膜上皮細胞のクロマチン凝集度を示したグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 坪田 一男
千葉県船橋市西船5丁目26番7号

(72)発明者 樋口 明弘
千葉県柏市西山1丁目15番5号
Fターム(参考) 4C206 DA02 KA13 MA01 MA04 MA78
NA14 ZA33